Archive of SID

ارزیابی توانایی برخی از جدایه های *Azotobacter chroococcum* بومی خاک های استان چهار محال و بختیاری در تولید مواد محرک رشد گیاه

سعیده رجایی[۱]، فایز رئیسی[۲] و حسینعلی علیخانی[۳]

چکیده

پتانسیل های مفید *Azotobacter chroococcum*، فراسوی تثبیت بیولوژیک نیتروژن، مانند تولید انواع فیتوهورمون‌های محرک رشد گیاه، این باکتری را در زمره ریزوباکتری های محرک رشد گیاه [۴](PGPR) قرار داده است. این تحقیق به منظور بررسی پتانسیل‌های محرک رشد گیاه در ازتوباکتر به اجرا در آمد. ابتدا برای تهیه جدایه-های *ازتوباکترکروکوکوم* بومی منطقه چهار محال و بختیاری نمونه برداری از ریزوسفر گندم در برخی گندم‌زارهای مهم استان انجام پذیرفت و شمارش جمعیت *A. chroococcum* در نمونه‌های خاک ریزوسفر انجام شد که بیشترین جمعیت میکروبی در اراضی تالاب چغاخورت و کمترین آن در منطقه جونقان بدست آمد. پس از خالص سازی و شناسایی جدایه‌های *A. chroococcum*، آزمون‌های درون شیشه شامل آزمون توان تولید [۵] IAA، توان حل فسفات، تولید سیدروفور [۶] و HCN [۷] و همچنین تثبیت بیولوژیک نیتروژن بر روی جدایه‌ها انجام گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده توانایی تولید IAA، HCN، سیدروفور، و تثبیت بیولوژیک نیتروژن در جدایه‌ها به اثبات رسید ولی کلیه جدایه‌ها فاقد توانایی انحلال فسفات بودند. در این میان بالاترین پتانسیل تولید مواد محرک رشد گیاه در تولید IAA و سیدروفور مشاهده گردید. به طور کلی بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون‌های درون شیشه چنین می‌توان گفت که بعضی از جدایه‌های *ازتوباکترکروکوکوم* بومی استان چهار محال و بختیاری در زمره باکتری های PGPR قرار خواهند گرفت و بنابراین حضور آنها در ریزوسفر می‌تواند باعث بهبود رشد و عملکرد گندم گردد.

کلید واژه ها: Azotobacter chroococcum، PGPR، IAA، سیدروفور، HCN ، تثبیت بیولوژیک نیتروژن و ریزوسفر گندم

مقدمه

تلاش برای افزایش تولید در واحد سطح و مصرف زیاد و نامتعادل کودهای شیمیایی در چند دهه گذشته، پیامدهای منفی زیست محیطی و افزایش هزینه تولید را به همراه داشته و ضرورت تجدید نظر در شیوه‌های جدید افزایش تولید محصول را گوشزد می‌نماید (۱۲). فراهم سازی شرایط لازم برای استفاده بیشتر از فرایندهای طبیعی مانند تثبیت بیولوژیک نیتروژن یکی از راهکارهای تولید بهینه محصول و مهمتر از آن حفظ مختلف بطور جدی دنبال می‌شود. بهره گیری از توان ریز جانداران سودمند در کشاورزی، یکی از سلامت محیط است که امروزه در کشورهای شیوه-های بیولوژیک برای افزایش تولید است که می-توانند به روش های مختلف باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه شوند. از جمله این موجودات می‌توان به ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه اشاره کرد. این گروه از باکتری های منطقه ریزوسفر از طریق مکانیسم‌های مختلف باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه شده که اصطلاحاً ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه و به اختصار PGPR نامیده می‌شوند (۱۶).

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد (rajaei_s@yahoo.com)
۲- دانشیار گروه خاکشانسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد
۳- استادیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

4- Plant Growth Promoting Rhizobacteria
5- Indole Acetic Acid
6- Siderphore
7- Hydrogen Cyanide

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۲/۸
تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

امروزه اثرات مستقیم و غیر مستقیم انواع PGPR بر روی رشد گیاه از طریق تولید فیتوهورمون های (اکسین‌ها[1]، سیتوکینین‌ها[2]، جیبرلین‌ها[3] و...) و یونوفورها[4] (سیدروفورها)، افزایش فراهمی عناصر غذایی و یا افزایش تحرک و قابلیت جذب آن عناصر، افزایش جوانه‌زنی، توسعه سیستم ریشه‌ای، فعالیت‌های آنزیمی چون ACC-دآمیناز[5] به منظور کاهش اثرات سوء اتیلن استرسی، تثبیت بیولوژیک نیتروژن مولکولی و نهایتاً کنترل عوامل بیماری زا به اثبات رسیده است (۱۵،۳۰). جنس ازتوباکتر جزء انواع باکتری‌های PGPR و یکی از دی آزوتروف هایی است که در سال های اخیر توجه محققین کشور را به خود جلب کرده است (۱). بعلاوه مطالعات انجام شده در سال های اخیر نشان داده است که گونه‌های مختلف این باکتری را می‌توان در زمره انواع ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه نیز قرار داد (۲۹). باکتری‌های جنس ازتوباکتر مستقیماً و به واسطهٔ تثبیت نیتروژن ملکولی، افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی و خصوصاً تولید فیتوهورمون های رشد گیاهی موجب بهبود شرایط تغذیه و رشد گیاه می‌شوند. این باکتری به علاوه از طریق کنترل عوامل بیماری‌زا، به طور غیر مستقیم نیز به حفظ سلامت گیاه کمک نموده که تأثیر نهایی آن، بهبود رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌باشد (۱۱،۲۰).

یکی از توانایی‌های ازتوباکتر تثبیت نیتروژن ملکولی است که معادل ۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هر هکتار در سال گزارش شده است (۲۳). راندمان تثبیت نیتروژن برای ازتوباکتر ۲ تا ۱۵ میلی‌گرم نیتروژن به ازای هر گرم کربن آلی می‌باشد (۲).

ازتوباکتر علاوه بر نقش خود در افزایش نیتروژن خاک توسط مکانیسم‌های دیگری نیز باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شود. به گزارش وسی[6] (۲۹) در تلقیح همزمان ریزوبیوم و ازتوباکتر در کشت سویا، جدایه‌هایی از ازتوباکتر که فاقد توان تثبیت نیتروژن بودند نیز اثر معنی داری در گره‌بندی سویا داشتند که آن را می‌توان به عواملی غیر از تغذیه نیتروژنی از جمله تولید فاکتورهای رشد توسط ازتوباکتر نسبت داد. در برخی از آزمایشات مشاهده شده‌است که حتی در سطوح و مقادیر کافی کودهای نیتروژن، تلقیح گیاهان با باکتری‌های دی‌ازوتروف از جمله ازتوباکتر موجب افزایش رشد و نمو گیاهان شده است که در این صورت احتمالاً وجود مکانیسم‌های دیگری به غیر از تثبیت نیتروژن، از جمله تولید مواد تنظیم کننده رشد مانند IAA علت افزایش رشد گیاه بوده است (۱۲،۳). به عقیده کندی و همکاران[7] (۱۲) همبستگی نزدیکی بین رشد گیاه و هورمون‌های تولید شده توسط ازتوباکتر وجود دارد.

علاوه بر تولید هورمون‌های محرک رشد، قابلیت انحلال فسفات در مورد ازتوباکتر مورد بررسی قرار گرفته است. کومار و نارولا[8] (۱۴) توانایی انحلال فسفات معدنی را در جدایه‌هایی از ازتوباکتر کروکوکوم گزارش نمودند و نشان دادند جدایه M15 ازتوباکتر کروکوکوم قادر است غلظت فسفر را در حضور تری کلسیم فسفات در حد ۱/۷۷ میکروگرم بر لیتر افزایش دهد در حالی‌که باسیلوس پلی میکسا[9] (جدایه استاندارد) غلظت فسفر محلول را در همان شرایط به ۲/۲۳ میکروگرم بر لیتر می‌رساند (۱۴). در یک تحقیق گارگ و همکاران[10]

1- Auxins
2- Cytoknins
3- Gibberllins
4- ionophores
5- ACC-daminase

6- Vessey
7- Kennedy *et al*.
8- Kumar & Narula
9- *Bacillus polymixa*
10- Garg *et al*.

www.SID.ir

Archive of SID

(۸) نشان دادند ازوتوباکتر کروکوکوم قادر است غلظت فسفر محلول را در محیط آبی در حضور سوبسترای آلی افزایش دهد.

سیدروفورها از دیگر متابولیت‌های تولید شده توسط ازتوباکتر می‌باشند که میل ترکیبی شدید برای پیوند شدن با یون آهن سه ظرفیتی دارند. سیدروفورها در واقع نوع خاصی از حامل‌های یونی هستند که افزایش تحرک آهن را به عهده دارند. برخی سلول‌های میکروبی به منظور مقابله با تنش کمبود شکل قابل جذب آهن اقدام به ترشح سیدروفور می‌کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که جدایه‌هایی از قادر به تولید سیدروفور در شرایط کمبود آهن می‌باشند و قابلیت تحرک آهن را در ریزوسفر افزایش می دهند (۲۸).

تولید هیدروژن سیانید (HCN) یکی دیگر از پتانسیل‌های مفید باکتری‌های PGPR است که اثر مثبت آن در کنترل برخی عوامل بیماری‌زای گیاهی به اثبات رسیده است (۴). مطالعات در مورد توانایی تولید HCN عمدتاً در بین باکتری‌های سودوموناس متمرکز بوده است در حالی‌که برخی از جدایه‌های PGPR نیز این خاصیت را از خود بروز می‌دهند (۴). در حال حاضر گونه‌های بیشتری از باکتری‌های سیانوژنیک (مولد HCN) شناسایی شده و مطالعات برای شناسایی سایر گونه‌های سیانوژن ادامه دارد. ازتوباکتر تاکنون در زمره باکتری‌های سیانوژن معرفی نشده لیکن ممکن است یکی از مکانیسم‌های رفتار آنتاگونیسمی در این باکتری تولید هیدروژن سیانید باشد که در این تحقیق جدایه‌های مختلف ازتوباکتر کروکوکوم از نظر رفتار سیانوژنی مورد بررسی قرار می‌گیرند. در حال حاضر در برخی از کشورها از ازتوباکتر به عنوان کود بیولوژیک در بسیاری محصولات کشاورزی از جمله غلات و سبزی ها استفاده می‌شود که البته میزان تأثیر گذاری آن بستگی به شرایط خاک و بویژه نوع جدایه ازتوباکتر دارد (۱۱). لذا بررسی پتانسیل جدایه های بومی به عنوان باکتری محرک رشد گیاه در خاک‌های هر منطقه امری ضروری به نظر می رسد. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی کمی و کیفی پتانسیل جدایه‌های بومی ازتوباکتر کروکوکوم مقیم ریزوسفر گندم در تولید مواد مختلف محرک رشد گیاه در خاک های استان چهار محال و بختیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری خاک

برای جداسازی ازتوباکتر کروکوکوم نمونه برداری خاک از مزارع گندم استان چهارمحال و بختیاری صورت گرفت. با توجه به سطح زیر کشت گندم در استان، نمونه برداری در سطح منطقه و ترجیحاً در دشت‌های مسطح و مهم تحت کشت گندم آبی استان (جدول ۱) و در هفته اول تیرماه ۸۳ انجام پذیرفت و تعداد ۶۳ نمونه خاک مرکب به روش پیمایش از قسمت های مختلف مزارع از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر ریزوسفر گندم بدست آمد.

جداسازی و خالص سازی جدایه های ازتوباکتر کروکوکوم و آزمون‌های درون شیشه

برای جداسازی ازتوباکتر کروکوکوم از هر نمونه خاک از روش خمیر اشباع خاک استفاده‌شد. پس از چند مرحله بازکشت کلنی‌های تیپیک بر روی محیط کشت اختصاصی وینوگرادسکی[1]، جدایه ها از نظر وجود سایر باکتری‌ها خالص سازی شدند (۱) و سلول های رویشی و سیست[2] آنها به کمک رنگ آمیزی گرم و میکروسکوپ مطالعه گردید. سپس آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شامل آزمون کاتالاز، اکسیداز و تولید اسید از قند بر روی جدایه‌ها صورت گرفت (۶). برای اندازه گیری جمعیت

1- Winogradsky
2- Cyst

www.SID.ir

Archive of SID

ازتوباکتر از روش شمارش تعداد کلنی استفاده شد و تعداد باکتری در هر گرم خاک تعیین گردید (۶). سپس آزمون‌های درون شیشه بر روی جدایه‌ها به شرح زیر انجام پذیرفت:

آزمون نیمه کمی و کمی توانایی تولید IAA

برای ارزیابی نیمه کمی توان تولید IAA به روش پیشنهادی بریک و همکاران[1](۵) محیط کشت جامد LB-Tryptophan (LBT) با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تازه با جمعیت یکسان شده 5×10^{8} cfu ml^{-1} به روش قطره گذاری تلقیح گردید. سپس برشی از کاغذ نیترو سلولز استریل روی سطح محیط کشت و باکتریها قرار گرفت و تا زمان رسیدن قطر کلنی باکتری به ۲ میلی‌متر در داخل انکوباتور نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان کاغذ نیتروسلولز از روی سطح محیط کشت جدا و با محلول معرف شیمیایی سالکووسکی[2] تیمارگردید که در نتیجه آن اطراف کلنی‌های ازتوباکتر که توان تولید IAA را داشتند هاله صورتی رنگی تشکیل شد که شدت رنگ و اندازه این هاله‌ها با توجه به مقدار IAA تولید شده توسط هر سویه، متفاوت بود. متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی برای هر جدایه محاسبه گردید. همچنین محلول های استاندارد IAA تهیه و با معرف سالکووسکی تیمار شد و هاله‌های صورتی اطراف آن با هاله‌های ازتوباکتر مورد مقایسه قرار گرفت. برای اندازه گیری کمی توانایی تولید IAA محیط کشت مایع LBT تهیه و با سوسپانسیون میکروبی تازه با جمعیت مساوی تلقیح و در داخل انکوباتور شیکردار قرار داده شدند (۲۷ °C و ۴۸ ساعت). پس از مساوی سازی جمعیت میکروبی با استفاده از معیار مک فارلند سوسپانسیون‌های میکروبی سانتریفیوژ و محلول شفاف رویی به آرامی جدا و به نسبت ۲ :۱ به معرف سالکووسکی افزوده شد. در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید (۲۶).

آزمون نیمه‌کمی انحلال فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول

برای اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان انحلال فسفات‌های نامحلول از سه محیط کشت LG، اسپربر[3] و NBRI-BPB[4] استفاده شد. در محیط کشت LG به جای نمک K_2HPO_4 و KH_2PO_4 از کلرور پتاسیم و تری‌کلسیم فسفات به عنوان فسفر معدنی نامحلول و در یک سری پلیت مجزا از اسید فیتیک[5] به عنوان فسفر آلی نامحلول استفاده گردید. سپس محیط با ۲ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی تازه با جمعیت مساوی در ۳ تکرار به روش نقطه گذاری تلقیح گردید و به مدت ۳ الی۴ هفته در انکوباتور قرار گرفتند. در فواصل زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۴ روز طی دوره انکوباسیون کلنی باکتری‌ها از نظر تولید هاله مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور

تشخیص نیمه کمی تولید سیدروفور در جدایه های ازتوباکتر کروکوکوم با استفاده از روش شوئین و نیلند بر روی محیط کشت کروم آزرول–اس (CAS) انجام گرفت. سوسپانسیون میکروبی در محیط کشتی با آهن کمتر از ۲۰ میکرولیتر تهیه و محیط کشت CAS–آگار با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون با جمعیت مساوی در حد 5×10^{8} cfu ml^{-1} به روش قطره‌گذاری در ۳ تکرار تلقیح گردید. قطر کلنی باکتری و قطر هاله اطراف آن در فواصل زمانی ۲، ۴ و ۸ روز اندازه گیری شد. به منظور مقایسه مقدار تولید سیدروفور در حالت‌های کمبود و وفور آهن، همچنین تعدادی از جدایه‌ها

1- Bric *et al.*
2- Salkowski
3- Sperber
4- National Botanical Research Institiue-Bromo Phenol Blue
5- Phytic Acid

www.SID.ir

Archive of SID

همزمان در محیط وینوگرادسکی آهن‌دار (محیط معمولی فاقد محدودیت آهن) رشد داده و روی محیط کشت CAS-آگار تلقیح شدند.

آزمون کیفی توان تولید هیدروژن سیانید

ارزیابی توان تولید HCN در جدایه ها به دو روش صورت پذیرفت. در روش اول بر اساس روش پیشنهادی لورک[1]، اصلاح شده توسط آلسترم[2] می باشد ابتدا محیط کشت جامد وینوگرادسکی تهیه و در ترکیب آن از گلایسین[3] استفاده گردید. سپس محیط توسط سوسپانسیون میکروبی تازه با جمعیت مساوی در سه تکرار تلقیح و در درب داخلی تمام پتری های تلقیح شده برشی از کاغذ صافی آغشته به معرف بیکربنات- پیکریک اسید چسبانده شد و به مدت یک هفته درون انکوباتور قرار گرفتند. روش دوم یک روش پیشنهادی است که همان روش آلسترم بر پایه ماده حامل می باشد. در این روش از حامل پرلیت[4] و محیط کشت مایع Nutrient Broth به اضافه گلایسین استفاده شد. محیط NB+Gly به پرلیت افزوده و اتوکلاو گردید و سپس تلقیح با سوسپانسیون میکروبی انجام گرفت. در صورت تولید HCN توسط باکتریها کاغذ صافی آغشته به محلول معرف که در درب هر پتری قرار گرفته است، از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر خواهد کرد. برای مقایسه بهتر نتایج، محلولهای استاندارد KCN تهیه و با تغییر رنگ حاصله در درب پتری‌ها مقایسه گردید.

آزمون کمی توانایی تثبیت نیتروژن ملکولی

برای بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی از روش احیاء استیلن به اتیلن و کروماتوگرافی گازی (GC) استفاده شد. ۲ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با جمعیت مساوی 5×10^{8} cfu ml^{-1} به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت مایع وینوگرادسکی (فاقد نیتروژن) اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، درب پنبه‌ای لوله‌ها با درهای پلاستیکی استریل تعویض شد و ۱۰ درصد حجم هوای داخل هر لوله با سرنگ تخلیه و ۱ میلی‌لیتر گاز استیلن به لوله‌ها تزریق گردید. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از سپری شدن این مدت، یک میکرولیتر از هوای داخل لوله با استفاده از سرنگ همیلتون[5] به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید و سطح زیر منحنی ایجاد شده قرائت شد (۲۳).

نتایج

نتایج آزمون برآورد جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم با روش شمارش کلنی در جدول ۱ نشان می دهد ازتوباکتر کروکوکوم در تمامی نمونه‌های خاک مورد مطالعه وجود دارد. بر طبق نتایج بیشترین جمعیت میکروبی در اراضی منطقه چغاخورت ($8/10\times10^{4}$ cfu/g soil) و کمترین آن در اراضی منطقه جونقان ($2/24\times10^{3}$ cfu/g soil) مشاهده‌شد.

جهت شناسایی میکروسکپی ازتوباکتر کروکوکوم، نمونه‌هایی که از کلنی‌های خالص تهیه و رنگ آمیزی گردید که در زیر میکروسکپ با اشکال تیپیک ازتوباکتر کروکوکوم مطابقت نشان دادند. همچنین تشکیل سیست در تمامی جدایه‌های منتخب برای آزمون‌های درون شیشه به اثبات رسید. از تعداد ۶۳ سویه، حدود ۶۴ درصد دارای کلنی شکل R (سخت و خشک) و بقیه دارای کلنی های شکل S (نرم) بودند. در تمامی جدایه‌ها در اثر استفاده از قند گلوکز، بعد از گذشت ۴۸ ساعت تشکیل سیست در کلنی‌های دو روزه آغاز گردید و در پایان هفته اول رنگ آنها کاملاً به قهوه‌ای

1- Lorck
2- Alstrom
3- Glycine
4- Perlite
5- Hamilton

www.SID.ir

Archive of SID

سوخته تا سیاه تغییر یافت. جدول ۲ نتایج برخی آزمایش‌های اولیه میکروسکپی و بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی ایزوله‌ها را نشان می دهد. نتایج آزمون تولید IAA نشان می دهد که جدایه های مختلف ازتوباکتر کروکوکوم توانایی تولید هورمون اکسین (IAA) را دارند. به علاوه اینکه این توانایی در بین جدایه‌های مختلف متفاوت است. طبق نتایج بدست آمده از مجموع ۶۳ جدایه ازتوباکتر بیش از ۹۰ درصد توان رشد بر روی محیط کشت جامد LBT را داشتند ولی تنها ۶۰ درصد توانایی تولید IAA را از خود نشان دادند. در جدول ۳ جدایه‌هایی که بر روی محیط LBT رشد کردند را از نظر توانایی ایجاد هاله به ۴ کلاس طبقه بندی شده اند. میزان کمی تولید IAA در جدایه های کلاس A و B که به روش رنگ سنجی اندازه گیری گردید در جدول ۴ ارائه شده است. بیشترین میزان تولید IAA

جدول ۱- جمعیت ازتو باکتر کروکوکوم در خاک‌های تحت کشت گندم آبی در مناطق مختلف استان چهار محال و بختیاری با روش شمارش کلنی

محل نمونه برداری	تعداد (cfu/g soil)		
	کمترین	بیشترین	متوسط *
چغاخورت	۱۷/۲۰×°۱۰^۳	۸/۱۰×۱۰^۴	۳/۸۵×۱۰^۴
دشت گندمان	۱۳/۷۵×۱۰^۳	۵/۴۳×۱۰^۴	۳/۵۲×۱۰^۴
دشت آلونی	۳/۳۹×۱۰^۳	۳/۱۸×۱۰^۴	۱/۱۰×۱۰^۴
فرخشهر	۸/۰۰×۱۰^۳	۱۶/۰۲×۱۰^۳	۱۰/۸۲×۱۰^۳
حمزه علی	۱۳/۷۵×۱۰^۳	۸/۱۰×۱۰^۴	۱۰/۲۰×۱۰^۳
اردل	۸/۵۸×۱۰^۳	۸/۶۰×۱۰^۳	۸/۵۹×۱۰^۳
بلداجی	۲/۵۰×۱۰^۳	۹/۳۵×۱۰^۳	۶/۸۰×۱۰^۳
دشت مرادان	۳/۶۰×۱۰^۳	۹/۲۰×۱۰^۳	۶/۶۷×۱۰^۳
فرادنبه	۵/۲۴×۱۰^۳	۷/۳۳×۱۰^۳	۶/۲۰×۱۰^۳
سفید دشت	۳/۷۵×۱۰^۳	۸/۵۹×۱۰^۳	۵/۶۲×۱۰^۳
دشت کوشکی	۳/۰۲×۱۰^۳	۷/۳۵×۱۰^۳	۵/۲۰×۱۰^۳
دشت شهرکرد	۲/۳۳×۱۰^۳	۸/۵۰×۱۰^۳	۵/۲۰×۱۰^۳
گودار کبک	۲/۹۰×۱۰^۳	۸/۲۴×۱۰^۳	۴/۹۰×۱۰^۳
جونقان	۲/۲۴×۱۰^۳	۶/۱۲×۱۰^۳	۳/۸۴×۱۰^۳
سورشجان	۲/۳۶×۱۰^۳	۳/۶۹×۱۰^۳	۲/۹۵×۱۰^۳

*مقادیر میانگین ۴ نمونه مرکب می باشند

جدول ۲- برخی خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه های مختلف ازتوباکتر کروکوکوم خاک‌های استان چهار محال و بختیاری

رنگ آمیزی گرم	تحرک	تشکیل سیست	تولید رنگ دانه قهوه ای نامحلول در آب	تولید اسید	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز
G-	+	+	+	+	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳- طبقه بندی سویه های ازتوباکتر کروکوکوم از نظر تولید IAA

کلاس	نسبت قطر هاله به کلنی	فراوانی ٪
D	۰	۲۷/۶۷
C	۲> DH/DC >۱	۴۳/۱۰
B	۳≥ DH/DC ≥۲	۲۰/۰۰
A	DH/DC >۳	۹/۲۳

^{DH}قطرهاله و ^{DC}قطر کلنی

جدول ٤- میزان تولید IAA در تعدادی از سویه های مختلف ازتوباکتر کروکوکوم

شماره سویه	قطر هاله به کلنی	IAA (mg/l/48h)*
۱۳	۶/۲	۷۰/۰ a**
۱۴	۲/۳	۵۹/۹ c
۲۰	۳/۳	۱۰/۷ f
۲۲	۲/۰	۶۳/۰ bc
۲۵	۷/۲	۷۲/۰ a
۲۷	۲/۶	۱۰/۰ f
۳۱	۳/۳	۶۰/۵ bc
۳۶	۲/۰	۳۶/۱ e
۳۹	۲/۳	۲/۲ g
۴۲	۳/۳	۴۹/۶ d
۵۲	۲/۰	۱۰/۰ f
۵۳	۲/۵	۴۰/۰ e
۶۰	۲/۰	۱۲/۰ f
۶۴	۲/۰	۶۶/۶ ab

* جمعیت میکروبی 5×10^{8} cfu ml^{-1}

**حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دارد

(۷۲ mg/l) متعلق به جدایه AZT-25 و کمترین مقدار تولید (۲/۲۷ mg/l) متعلق به جدایه AZT-39 می باشد. همچنین بین جدایه ها از لحاظ تولید IAA اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدماتی توان حل فسفات های معدنی و آلی توسط جدایه‌های ازتوباکتر کروکوکوم بر روی سه محیط کشت اسپربر، NBRI-BPB و LG نشان داد که جدایه-های ازتوباکتر بدست آمده از برخی گندم‌زارهای استان چهارمحال و بختیاری قادر به انحلال فسفاتهای معدنی و آلی نمی‌باشند و هیچ هاله شفافی مبنی بر انحلال فسفات نامحلول محیط اطراف کلنی‌ها مشاهده نشد. با این وجود جدایه‌ها در هر سه محیط به خوبی رشد نموده و محیط‌های انتخابی اثر بازدارندگی روی رشد ازتوباکتر کروکوکوم نداشتند.

نتایج آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور در ۶۳ جدایه ازتوباکتر کروکوکوم نشان می‌دهد برخلاف بازدارندگی محیط CAS-آگار برای تعدادی از میکروارگانیزم‌ها، ازتوباکتر کروکوکوم قادر به رشد

www.SID.ir

Archive of SID

بر روی این محیط است و بـه وضـوح توانـایی و یـا عدم توانایی تولید سیدروفور را از خود نشان می‌دهد. از بین تمام جدایه‌ها تنها ۱۲ درصـد آنهـا در محـیط کشت انتخابی CAS–آگار قادر به رشـد نبودنـد و از بین ۸۷ درصد جدایه‌های رشد یافته بر روی محـیط، بیش از ۹۰ درصد آنها قابلیت تولیـد سـیدروفور را از خود نشان دادند و تنها در حدود ۹/۶ درصد واکـنش تغییر رنگ در محیط ایجاد نکرده که نـشان دهنـده عدم تولید سیدروفور می‌باشد. همچنین میزان تولیـد سیدروفور در بین جدایـه‌هـای تولیـد کننـده (Sid^+) متفاوت مـی‌باشـد. نـسبت قطـر هالـه بـه کلنـی در جدایـه‌هـای Sid^+ در چهـارکلاس متفـاوت طبقـه بندی گردید (در جدول ۵). با توجه به یکسان بودن مقدار مایه تلقیح نسبت قطر هاله به کلنی مـی‌توانـد معیار مناسبی بـرای مقایـسه تولیـد سـیدروفور بـین جدایه‌ها به حساب آید. متوسط قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مختلف ازتوباکتر در سـه زمـان ۲، ۴ و ۸ روز اندازه گیری و طبقه بندی شد. تقریباً ۵۸ درصـد جدایه‌ها از نظر تولید سـیدروفور در کـلاس C قـرار گرفتند و متوسـط قطـر هالـه بـه کلنـی در آنهـا در دامنه۴–۱ بود. حدود ۲۲ درصد سویه هـا در کـلاس A قرار گرفتند که دارای قطر هالـه بـه کلنـی آنهـا بزرگتر یا مساوی ۶ مـی‌باشـد. در بـین جدایـه‌هـای کـــلاس A جدایـــه‌هـــای AZT-23 وAZT-26 بیشترین میزان تولیـد سـیدروفور را داشـته و بعـد از گذشت ۸ روز تمامی سطح محیط کشت از آبـی بـه نارنجی تغییر رنگ داد. همچنین نتایج کشت این دو جدایه در محیط غنی از آهن و تلقیح مجدد آن روی محیط کشت CAS–آگار نشان داد سیدروفور تولیـد شده در این مرحله نسبت بـه مرحلـه قبـل کـاهش چشمگیری داشته است. همانطوری که در جـدول ۶ مشخص شده است متوسط قطر هالـه بـه کلنـی در جدایه‌های ۲۶ و ۲۳ که قبل از تلقیح در روی محیط CAS–آگار در یک محیط غنـی از آهـن رشـد داده شده بودند نسبت به تیمار شاهد (بدون حضور آهـن) ۴ و ۴/۹ واحد کاهش نشان می‌دهد. این امـر نـشان می‌دهد که معمـولاً سـیدروفورها در شـرایط کمبـود آهن در محیط ترشح می‌شوند.

جدول ۵- طبقه بندی سویه های ازتوباکتر کروکوکوم بر اساس نسبت قطر هاله به کلنی در محیط کشت CAS- آگار

کلاس	نسبت قطر هاله به کلنی	فراوانی ٪
D	۰	۹/۶۷
C	۱ -۴	۵۸/۰۸
B	۴ -۶	۹/۶۷
A	۶≤	۲۲/۵۸

جدول ٦- نسبت قطر هاله به کلنی در حضورو عدم حضور آهن محلول در محیط کشت مادر

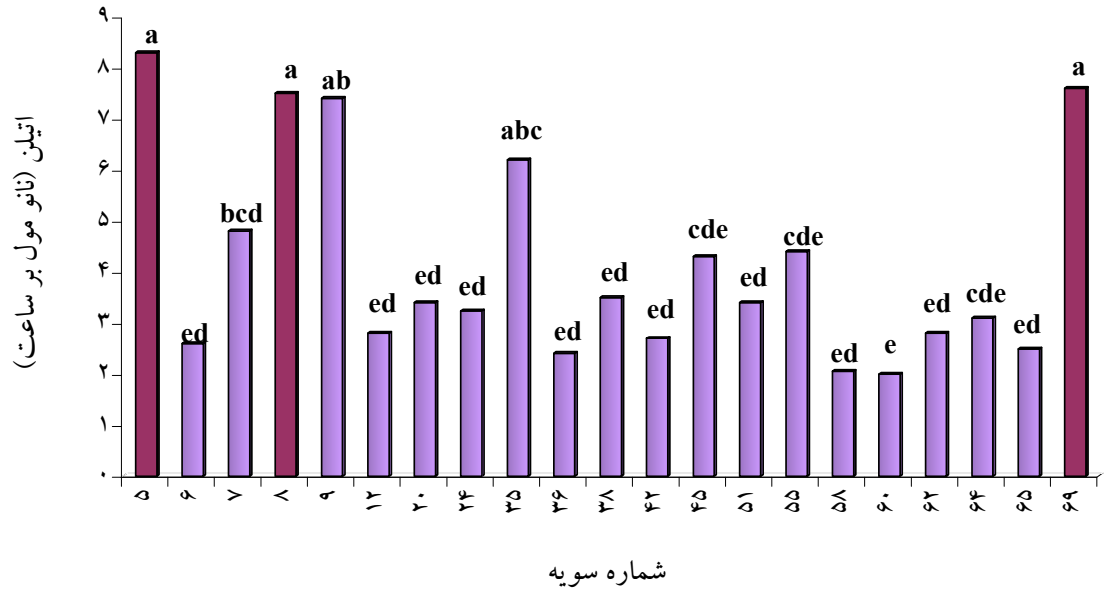
شماره سویه	نسبت قطر هاله به کلنی(٤ روز)	
	بدون آهن	در حضور آهن
AZT-23	۵/۲	۱/۲
AZT-26	۶/۲	۱/۳

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از آزمون کیفی توان تولید هیدروژن سیانید در ۶۳ سویه ازتوباکتر کروکوکوم نشان داد تنها دو سویه ۳۶ و ۱۱ توانایی بالایی در تولید HCN از خود نشان دادند و رنگ آجری ایجاد شده در کاغذها با رقت ۸ نانومول کاغذ استاندارد همخوانی دارد. در جدایه‌های ۷، ۴۱، ۶۱، ۶۵، ۶۶ و ۶۹ تغییر رنگ از زرد به کرم ایجاد شد که تقریباً با غلظت ۴ نانومول کاغذ استاندارد مطابقت دارد. در بقیه جدایه‌ها تغییر رنگی در کاغذ معرف ایجاد نشد. نتایج به دست آمده با استفاده از روش پیشنهادی آزمون HCN بر پایه ماده حامل (پرلیت) گزارش شده است و نتایج آزمون HCN تقریباً ۷۰٪ درصد جدایه‌ها در محیط کشت وینوگرادسکی حاوی گلایسین قادر به رشد نبودند و بعد از تلقیح سوسپانسیون میکروبی در سطح آگار هیچ کلنی تشکیل نگردید. در مورد ازتوباکتر کروکوکوم روش پیشنهادی آزمون HCN بر پایه ماده حامل دارای کارآیی بهتری نسبت به روش آلسترم می باشد.

مقدار اتیلن تولید شده توسط جدایه‌های مختلف ازتوباکتر کروکوکوم در نمودار ۱ نشان داده شده است. در بین ۶۳ جدایه ازتوباکتر مورد بررسی تنها ۳۴ درصد جدایه‌ها توان تثبیت نیتروژن ملکولی را از خود نشان دادند یا به عبارت بهتر میزان احیاء استیلن تنها در ۳۴ درصد جدایه‌ها به روش GC قابل اندازه‌گیری بود. در صورتی که تمامی جدایه‌ها در محیط فاقد نیتروژن (NO_3^- ,NH_4^+) قادر به رشد بودند. طبق نتایج بدست آمده توانایی احیاء استیلن به اتیلن در بین جدایه‌های مختلف متفاوت می‌باشد و دارای اختلاف آماری معنی دار بود. بیشترین میزان احیا استیلن به اتیلن در جدایه AZT-5 (۸/۳ نامول بر ساعت) وکمترین آن در جدایه AZT-60 (۲ نامول بر ساعت) مشاهده شد.



نمودار ۱- مقدار اتیلن تولید شده توسط جدایه های مختلف ازتو باکتر کروکوکوم بدست آمده از خاک های تحت کشت گندم در استان چهار محال و بختیاری

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بر طبق نتایج به دست آمده بیشترین جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم مربوط به زمین های محدوده تالاب چغاخورت و کمترین آن متعلق به گندم زارهای جونقان می‌باشد. بعد از تالاب چغاخورت دشت گندمان بالاترین جمعیت میکروبی را دارا می‌باشد. زمین های تحت کشت تالاب چغاخورت جزء زمین های پست استان بوده و به علت بالا بودن سطح آب زیر زمینی و رطوبت بالا دارای مواد آلی زیاد هستند. دشت گندمان نیز دارای سردترین اقلیم در بین مناطق تحت نمونه برداری می‌باشد. در حالی‌که خاکهای زمین های دشت جونقان و سورشجان معمولاً به علت وجود اقلیم گرم تر، خاک‌هایی با مواد آلی و رطوبت کمتر می‌باشند. از آنجایی که خصوصیات خاکهای تحت نمونه برداری مانند اطلاعات مواد آلی خاک بطور دقیق در دست نیست این امر قضاوت در مورد تغییرات جمعیت میکروبی مشکل می‌سازد.

در میان جدایه های ازتوباکتر کروکوکوم بدست آمده از خاکهای استان چهار محال و بختیاری بیش از ۶۰ درصد جدایه ها قادر به تولید هورمون IAA بودند. نتایج بدست آمده از این آزمون با نتایج سایر محققین مطابقت دارد. از دیر باز ازتوباکتر کروکوکوم به عنوان یک باکتری تولید کننده IAA معرفی شده است. به گزارش احمد و همکاران[1] (۳) هنگامی که به محیط کشت ازتوباکتر کروکوکوم تریپتوفان اضافه شود این باکتری هورمون IAA تولید می‌کند.

یاسمین و همکاران[2] (۳۱) میزان تولید IAA توسط جدایه‌هایی از ازتوباکتر، آزوسپریلیوم و باسیلوس را با استفاده از روش HPLC اندازه گیری نمودند و بیشترین مقدار تولید IAA را برای بعضی جدایه‌های ازتوباکتر (۹۰/۸ ± ۱۰ mg/l) به دست آوردند.

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که جدایه های ازتوباکتر کروکوکوم بومی بدست آمده از منطقه چهارمحال و بختیاری قادر به انحلال فسفات های آلی و معدنی نمی‌باشند. علت استفاده از سه محیط مختلف در آزمون انحلال فسفات های نامحلول تنوع منبع نیتروژنی برای باکتری ها می باشد. در محیط اسپربر منبع نیتروژنی عصاره مخمر است و در محیط NBRI–BPB از NH_4Cl به عنوان منبع نیتروژنی استفاده شده است در حالی که در محیط کشت LG منبع نیتروژنی همان نیتروژن ملکولی اتمسفر بود. طبق نظر ناتیال[3] (۲۲) غلظت بیش از نیم گرم در لیتر عصاره مخمر تأثیر منفی بر انحلال فسفات های معدنی دارد در حالی که کومار و نارولا (۱۴) مشاهده نمودند که توان حل فسفات های معدنی توسط جدایه‌های باکتریایی در محیط فاقد NH_4^+ و حاوی ۰/۴ گرم در لیتر عصاره مخمر افزایش می‌یابد. با این وجود در این آزمایش از یک محیط کشت فاقد نیتروژن نیز استفاده شد تا وضعیت انحلال فسفات در این حالت نیز مورد بررسی قرار گیرد. ولی با وجود استفاده از سه محیط مجزا، قابلیت انحلال فسفات توسط ازتوباکتر در هیچ یک از جدایه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. یاسمین و همکاران (۳۱) نیز جدایه‌های مختلف ازتوباکتر ریزوسفر برنج را فاقد توانایی انحلال فسفات گزارش نمودند. همچنین گزارش‌های مشابه مبنی بر عدم انحلال فسفات درجدایه‌های ازتوباکتر کروکوکوم بوسیله کیوندا و گائور ارائه شده‌است. از طرفی گروهی از محققین اعتقاد دارند ازتوباکتر به تنهایی قادر به انحلال فسفات های معدنی نبوده ولی تلقیح همزمان آن همراه با باکتری های حل کننده فسفات اثر معنی‌دار و مفیدی روی رشد گیاه

1- Ahmad *et al*.
2- Yasmin *et al.*
3- Nautiyal

www.SID.ir

Archive of SID

دارد. همچنین اثر باکتری های حل کننده فسفات روی رشد گیاه به همراه ازتوباکتر بیشتر از زمانی خواهد بود که این باکتریها به تنهایی به عنوان مایه تلقیح اضافه شوند. احتمالاً ازتو باکتر از طریق افزایش رشد ریشه و تولید مواد کلات کننده درجذب هر چه بیشتر فسفری که توسط باکتری های حل-کننده انحلال یافته‌است به گیاه کمک می‌کند (۱۵). در واقع توانایی انحلال فسفات در محیط به عوامل مختلف بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به نوع و مقدار اسیدهای آلی، نوع منبع کربنی مورد استفاده میکروارگانیزم‌ها، نوع منبع فسفاته (مینرالوژی و ترکیب شیمیایی منبع فسفاته)، سایر عناصر مانند فلزات سنگین و نوع محیط کشت اشاره نمود. تمامی این عوامل قادر هستند پتانسیل انحلال فسفات در میکروارگانیزم‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۲۵). در این بررسی توانایی انحلال فسفات های معدنی و آلی (تجزیه فسفات های آلی) تنها در سه نوع محیط جامد مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج مطالعات در مورد نوع محیط کشت لازم است قابلیت انحلال فسفات توسط ازتوباکتر در محیط مایع نیز مورد مطالعه قرار گیرد. به عقیده ناتیال (۲۲) تشخیص قابلیت انحلال فسفات های نامحلول توسط میکروارگانیزم‌های خاکزی بر اساس تکنیک هاله روش شناخته شده و مفیدی می‌باشد، لیکن این روش ممکن است فقط در مورد برخی جدایه‌های باکتریایی کارآیی لازم را نداشته باشد. بنابراین استفاده از محیط‌های کشت مایع فسفر نامحلول به جای استفاده از محیط جامد در این موارد کارآمدتر به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه رشد ازتوباکتر در محیط مایع pH را کاهش می‌دهد و کاهش pH خود یکی از عوامل انحلال فسفات قلمداد می‌گردد، لذا ممکن است این باکتری قادر به انحلال فسفات در محیط مایع باشد.

نتایج حاصل از آزمون تولید سیدروفور نشان می‌دهد جدایه‌های ازتوباکتر کروکوکوم مورد استفاده در این بررسی قابلیت نسبتاً خوبی در تولید سیدروفور دارند که با نتایج سایر پژوهشگران نظیر شیوپراساد و پیج مطابقت دارد. رنگ هاله ایجاد شده اطراف کلنی در برخی جدایه ها روشن‌تر و در برخی جدایه ها تیره‌تر بود. هاله اطراف کلنی همه جدایه‌های ازتوباکتر مورد استفاده در این تحقیق، نارنجی تا نارنجی مایل به قرمز می‌باشد. میلاجرس و همکاران[1] (۱۹) معتقدند که در محیط CAS- آگار سیدروفورهای منوهیدروکسامات و تری هیدروکسامات به ترتیب رنگ نارنجی مایل به قرمز و نارنجی ایجاد می‌کنند، در حالی که کمپلکس‌های کاتکولی موجب تغییر رنگ محیط از آبی به ارغوانی تا قرمز مایل به ارغوانی می‌گردند. پس با توجه به رنگ هاله در اطراف جدایه‌ها می-توان احتمال داد که سیدروفورهای تولید شده توسط این جدایه‌ها از نوع هیدروکساماتی باشند. از آنجایی که باکتری های توانمند در تولید سیدروفور می‌توانند به عنوان عوامل محرک رشد گیاه مورد استفاده قرار گیرند، انتخاب جدایه‌هایی از ازتوباکتر که توانایی بالایی در تولید این متابولیت داشته باشند در کشاورزی و تهیه کودهای بیولوژیک محرک رشد گیاه اهمیت خاصی پیدا می‌کند.

طبق نتایج بدست آمده از آزمون تولید HCN تنها دو عدد از جدایه‌های مورد بررسی توانایی نسبتاً خوبی در تولید HCN از خود نشان دادند. همچنین از نتایج اینطور برداشت می‌شود که جدایه‌های دارای مسیر متابولیسمی گلایسین احتمالاً سیانوژن می‌باشند. در بررسی منابع برای این تحقیق گزارشی مبنی بر سیانوژنیک بودن ازتوباکتر کروکوکوم منتشر نشده است. تقریباً ۷۰٪ درصد جدایه‌ها در محیط کشت وینوگرادسکی حاوی گلایسین قادر به رشد نبودند که این مسأله ممکن است به علت بازدارندگی گلایسین برای برخی

1- Milagers *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌ها باشد. یکی از مشکلات تلقیح ناموفق ازتوباکتر کروکوکوم ممکن است عدم کلنیزاسیون مؤثر در منطقه ریزوسفر باشد که علت آن می‌تواند حذف رقابتی ازتوباکتر توسط گونه‌های آنتاگونیسم باشد. تولید هیدروژن سیانید یکی از مکانیسم‌های آنتاگونیستی در منطقه ریزوسفر می‌باشد. استفاده از جدایه‌های سیانوژنیک ازتوباکتر کروکوکوم علاوه برکنترل عوامل بیماری‌زا می‌تواند منجر به کلنیزاسیون بهتر باکتری در منطقه ریزوسفر گردد. علاوه بر این یافتن یک محیط کشت مناسب برای بررسی توانایی تولید HCN در ازتوباکتر کروکوکوم همچنان نیاز به مطالعات بیشتری خواهد داشت.

در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز به روش احیاء استیلن به اتیلن انتظار می‌رفت تمامی جدایه‌ها استیلن را به اتیلن احیاء کند اما تنها ۳۴ درصد آنها پتانسیل تثبیت را از خود بروز دادند. این در حالی بود که تمامی جدایه‌ها در یک محیط فاقد منبع نیتروژن نیتراتی و آمونیومی قادر به رشد بودند. قابلیت تثبیت نیتروژن ملکولی در ازتوباکتر ثابت شده و این باکتری از دیرباز به عنوان یک تثبیت کننده ازت ملکولی شناخته شده است (۲۹). بنابراین احتمال می‌رود میزان فعالیت نیتروژناز در جدایه‌هایی که قابلیت تثبیت را از خود نشان ندادند به قدری کم بوده که توسط روش کروماتوگرافی گازی قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد. لذا روشهای دیگری مانند روشهای ایزوتوپی برای اندازه‌گیری فعالیت نیتروژناز توصیه می‌شود. اندازه گیری فعالیت نیتروژناز توسط روش احیا استیلن و کروماتوگرافی گازی برای مقادیر بالای تثبیت نیتروژن و یا به عبارتی فعالیت بالای آنزیم نیتروژناز مناسب است در حالی که در روشهای ایزوتوپی حتی مقادیر بسیار پایین تثبیت نیز قابل اندازه‌گیری هستند (۱۷). از آنجایی که ازتوباکتر کروکوکوم یک تثبیت کننده آزادزی بوده و وابستگی شدیدی به مواد آلی خاک دارد میزان تثبیت نیتروژن در آن خیلی پایین‌تر ازسایر باکتریهای همزیست و همیار می‌باشد. همادنشان داد فرآیندهایی مانند بسته بندی ازتوباکتر در داخل کپسول آلژیناتی می‌توانند علاوه بر حمایت باکتری در برابر فاژها باعث افزایش توان تثبیت بیولوژیک این باکتری شود.

آزمون‌های کمی اندازه گیری میزان تولید IAA و احیاء استلین حاکی از وجود اختلاف آماری معنی دار بین جدایه‌های مختلف می‌باشد. بررسی اینکه آیا این اختالافات معنی دار در شرایط کشت نیز دارای تأثیرات معنی دار می‌باشند یا خیر نیاز به مطالعات دقیق تر در حضور گیاه خواهد داشت.

بطور خلاصه مجموع آزمون‌های درون شیشه‌ای صورت گرفته بر روی جدایه‌های مختلف ازتوباکتر کروکوکوم نشان داد این جدایه‌ها از چند جنبه تولید عوامل محرک رشد گیاه را از خود بروز دادند. مهمتر اینکه جدایه‌های بومی هر منطقه می‌توانند از نظر تولید عوامل محرک رشد گیاه بسیار متفاوت عمل نمایند. هر چند بر اساس آزمون انحلال فسفاتهای آلی و معدنی جدایه‌های مورد نظر در زمره ریزوباکتریهای حل‌کننده فسفاتهای نامحلول قرار نمی‌گیرند لیکن این باکتریها قادر به تولید هورمون‌های رشد گیاهی از نوع اکسین‌های ایندولی (IAA) می‌باشند. لذا از این طریق می‌توانند مستقیماً موجب افزایش رشد گیاه شوند. بعلاوه جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق، توانایی تولید سیدروفور را از خود نشان دادند. سیدروفورهای تولید شده ممکن است مستقیماً در تغذیه گیاه نقش داشته باشند. تولید HCN نیز در تعدادی از جدایه‌ها مشاهده شد که این جنبه اخیر می‌تواند در کنترل شیمیایی عوامل بیماری‌زای گیاهی ایفای نقش نماید. در مرحله بعدی برای مطالعه دقیق‌تر این اثرات و بررسی توانایی جدایه‌هادر تحریک رشد گیاه، تلقیح باکتری به گیاه و اجرای کشت گلخانه و مزرعه‌ای ضروری به نظر می‌رسد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. خسروی، ه، صالح راستین، ن و محمدی، م. ۱۳۷۹. بررسی فراوانی، انتشار و برخی خصوصیات فیزیولوژیک ازوتوباکتر کروکوکوم در خاکهای زراعی استان تهران. مجله علوم خاک و آب. شماره ۱۲، صص ۸۶-۹۶.

۲. صفری سنجانی، ع ا. ۱۳۸۲. بیولوژی و بیوشیمی خاک. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا همدان. ۳۸۳ ص.

3. Ahmad, F., Ahmah, I., and Khan, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolated of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of Tryphtophan. Turkish Journal of Biology, 29: 29-34.

4. Alstrom, S., and Burn, R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant inhibition. Biology and Fertility of Soil, 7: 232-238.

5. Bric, J.M., Bostok, R.M., and Silverstone, S.A. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Applied and Environmental Microbiololy, 57:535-538.

6. Cappuccino, J.G., and Sherman, N. 1987. Microbiology: A Laboratory Manual, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc, New York, 105-300.

7. Faccini, G., Garzon, S., Martinez, M., and Valera, A. 2000. Evaluation of the effect of a dual inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and Azotobacter chroococcum in creole potato (Papa "Criolla") (Solanum phureja) variety 'Yema de Huevo'. School of Sience Bacteriology Department, Pontificia Universidad Javeriana. Santafe de Bogota, Colombia, 20 p.

8. Garg, S.K., Bhatnagar, A., Kalla, A., and Narula, N. 2001. In vitro nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by Azotobacter strains in an aquatic system. Bioresource Technology, 9: 101-109.

9. Hammad, A.M.M. 1998. Evaluation of alginate-encapsulated Azotobacter chroococcum as a phage-resistant and an effective inoculum. Journal of Basic Microbiology, 38: 9-16.

10. Holder, A.K., Bhattacharyya, P., and Chakrabartty, P.K. 1990. Solubilization of rock phosphate by Rhizobium and Bradyrhizobium. Journal of General Microbiology, 36: 81-92.

11. Kader, M.A., Main, M.H., and Hoque, M.S. 2002. Effects of Azotobacter inoculant on the yield and nitrogen up take by wheat. Online Journal of Biological Sciences, 2: 259-261.

12. Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., and Keeskes, M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming system: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. Soil Biology and Biochemistry, 16: 120-131.

13. Kleopper, J.W. 2003. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6th International PGPR Workshop. Calicut, India, 5-10 October, pp: 17-23.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Kumar, V., and Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphate and growth emergence of wheat as affected by Azotobacter chroococcum mutans. Biology and Fertilty of Soils, 28: 301-305.

15. Kumar, V., Kumar, A.N., and Singn, B.P. 2003. Performance and persistence of phosphate solubilizing Azotobacter chroococcum in wheat rhizosphere. Folia-Microbiologica, 5: 343-347.

16. Lynch, J.M. 1990. The Rhizosphare. John Wiley and Sons Ltd. Chichester. England, 300p.

17. Martensson, A.M., and Ljunggren. H.D. 1984. A comparision between the acethylene reduction method, the isotope dilution method and the total nitrogen difference method for measuring nitrogen fixation in lucerne. Plant and Soil, 81: 177-184.

18. Mehta, S., and Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitativa screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiology, 43: 51-56.

19. 19.Milagers, M.F., Machuca, A., and Napoleao, D. 1999. Detection of siderophore production from sevrel fungi and bacteria by chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiological Method, 37: 1-6.

20. Mrkovacki, N., and Milic, V. 2001. Use of Azotobacter chroococcum as potential useful in agricultural alication. Annual review Microbiology, 51: 145- 158.

21. Narula, N., Kumar, V., Behl, R. K., Deubel, A., Gransee A., and Merbach, W. 2000. Effect of P-solubilizing Azotobacter chroococcum on N, P and K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. Journal of Plant and Nutrition, 163: 393-398.

22. Nautiyal C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170: 265-270.

23. Ravikumar, S., Kathiresan, K., Ignatiammal, S.T. M., Selvam, M.B., and Shanthy, S. 2004. Nitrogen–fixation Azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. Journal of Experiment Marine Biology and Ecology. 15: 157-160.

24. Rodelas, B., Gonzalez-Lopez, J., Pozo, C., Salmeron, V., and Martinez-toledo, M.V. 1999. Response of Faba been (Vicia faba L.) to combined inoculation with Azotobacter and Rhizobium leguminosarum bv. Viceae. Soil Ecology, 12: 51-59.

25. Rodriguez, H., and Fraga. R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advance, 17: 319-339.

26. Rubio, M.G. T., Plata, S.A., Castillo, J.B., and Nieto. P.M. 2000. Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp.and Pseudomonas sp., producers of Indole-3-Acetic Acid and siderophores from Colombian Rice Rhizosphere. Revista Latinoamrican de Microbioloia, 5: 171-176.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Schywn, B., and Nielands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Annual Review of Biochemistry, 160: 47-56.

28. Shivprasad, S., and Page. W.J. 1989. Catechole formation and melanization by Na^+-dependent Azotobacte rchroococcum: a protective mechanism for aeroadatation. Environmental Microbiology, 55: 1811-1817.

29. Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255: 571-586.

30. Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1989. Cyanide production by Pseudomonas fluorescens helps suress black root of tobacco under gnotobiotic condition. EMBO Journal, 8: 351-358.

31. Yasmin, S., Bakar, M.A.R., Malik, K.A., and Hafeez, F. 2004. Isolation, character-rization and benefical effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanibar soils. Journal of Basic Microbiology, 44: 241-252.

www.SID.ir